

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2001年3月15日 (15.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/18060 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 17/02, (SHIMIZU, Shinji) [JP/JP]; 〒524-0041 滋賀県守山市勝部4丁目3-11-302 Shiga (JP). 久保田昌裕 (KUBOTA, Masahiro) [JP/JP]; 〒525-0034 滋賀県草津市草津2丁目2-15-703 Shiga (JP). 秋山英雄 (AKIYAMA, Hideo) [JP/JP]; 〒248-0034 神奈川県鎌倉市津西1丁目31-22-S103 Kanagawa (JP). 臼井美奈 (USUI, Mina) [JP/JP]; 〒242-0006 神奈川県大和市南林間8丁目17-4 Kanagawa (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/06172
- (22) 国際出願日: 2000年9月8日 (08.09.2000)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): JP, US.
- (30) 優先権データ: 特願平11/254463 1999年9月8日 (08.09.1999) JP (84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 東レ株式会社 (TORAY INDUSTRIES, INC.) [JP/JP]; 〒103-8666 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号 Tokyo (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 清水晋治

(54) Title: MATERIALS FOR EXTRACORPOREAL CIRCULATION, ADSORBENTS FOR DIABETIC COMPLICATION FACTORS, CONTAINERS FOR ELIMINATING DIABETIC COMPLICATION FACTORS AND METHOD OF ELIMINATING DIABETIC COMPLICATION FACTORS

(54) 発明の名称: 体外循環用材料、糖尿病合併症因子吸着体、糖尿病合併症因子除去容器および糖尿病合併症因子除去方法

(57) Abstract: Available adsorbents which make it possible to selectively adsorb and eliminate diabetic complication factors such as carbonyl stress products causing various vascular lesions (arteriosclerosis, etc.) in a state where carbonyl stress has been abnormally promoted as the result of excretory dysfunction or metabolic error due to diabetes, artificial dialysis or the like. Materials for extracorporeal circulation wherein a peptide having the full sequence of a specific receptor amino acid sequence or a part thereof is fixed on a water-insoluble carrier.

(57) 要約:

糖尿病や人工透析など排泄・代謝機能が低下した結果などでカルボニルストレスが病的に亢進した状態で、動脈硬化などの各種血管病変の原因となるカルボニルストレス産物などの糖尿病合併症因子を選択的に吸着除去しうる供給可能な吸着体を提供することを目的とする。特定の受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を有するペプチドを水不溶性担体に固定した体外循環用材料、糖尿病合併症因子吸着体および糖尿病合併症因子除去方法を提供する。

明細書

体外循環用材料、糖尿病合併症因子吸着体、糖尿病合併症因子除去容器および糖尿病合併症因子除去方法

技術分野

本発明は、特定の受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を有するペプチドまたはカルボニルストレス産物をエピトープとする抗体を水不溶性担体に固定した体外循環用材料、及び、被処理液に含有される糖尿病合併症因子を除去するための吸着体及び容器、それらを用いた糖尿病合併症因子除去方法に関する。

背景技術

近年、生活習慣病と言われる病気が顕著に増加して問題視されている。生活習慣病の中には、糖尿病や高脂血症などが原因で動脈硬化に代表される様々な血管病変を引き起こす疾患が含まれ、患者の予後を大きく左右する 경우가少なくない。特に糖尿病に至っては、罹患期間に依存して腎糸球体に病理学的変化が出現し、さらに悪化すると腎不全を伴い、透析を施行しなければならなくなる。透析導入患者の原疾患を見ると、1998年末にはこれまで主原因であった慢性糸球体腎炎を追い抜き、糖尿病性腎症が主原因となり、今後も増加する透析患者の数を後押しするのは確実である。しかし、その詳細な発症機序については不明で、現在も医学の大きな問題である。

近年、これらの血管病変を発症する原因として、AGE (advanced glycation endproducts) に代表される各種変性物質に注目が集まっている。AGEとは、主に糖尿病性合併症の原因物質と考えられているものであり、血液中に存在するブドウ糖に代表される還元糖、その代謝産物や反応産物とタンパク質や脂質などの低分子が酵素の関与なしに結合する前進性糖化反応 (advanced glycation) の産物である。化学反応の面で見ると、反応側のカルボニル基と非反応側のアミノ酸の塩基性官能基などに代表される求核性反応基との反応といえる。そのために、これら前進性糖化反応をはじめとする各種変性反応を総じてカルボニルストレスと

も呼ぶようになり(腎と透析、47巻別冊、1996頁、1999年)、また、その変性反応物をカルボニルストレス産物とも呼ぶようになった。また最近では、このカルボニルストレスに活性酸素やヒドロキシラジカルに代表されるラジカル体などによる生体中で生成される酸化反応が複雑に影響してカルボニルストレス産物が形成されることがわかってきた(臨床透析、14巻、4号、413頁、1998年)。

AGEに代表されるカルボニルストレス産物が主に糖尿病性合併症の原因物質と考えられている説は、(Annals of Internal Medicine、101巻、527頁、1984年)や(The New England Journal of Medicine、325巻、836頁、1991年)などに記述されている。また、透析患者など排泄機能に障害のある場合にもカルボニルストレス産物が蓄積する傾向にあることが知られている。

当時は、還元糖等とタンパク質等の非酵素的反応体であるカルボニルストレス産物について、蛍光性、褐色性、架橋性、脱水、酸化、縮合、転移など様々な特徴が発見されたが、どれもカルボニルストレス産物が持つ病因性を直接説明できるものではなかった。カルボニルストレス産物の一つであるAGEの評価方法についても、以前はその特徴の一つである蛍光特性で血液中の測定を試みている例がよくあり、特開平6-312134号公報では、ヒト血漿中のAGEを(The New England Journal of Medicine、325巻、836頁、1991年)の838頁に従い、励起波長390nm、蛍光波長450nmで測定を試みている。しかし、蛍光測定は試験管内の前進性糖化反応の確認には用いられるが、血液中では夾雑物や薬剤の非特異蛍光の影響も多くあることと、また、ペントシジンなど励起波長335nm、蛍光波長385nmといった異なる蛍光特性のものも発見されるなど(Journal of the American Society of Nephrology、7巻、8号、1198頁、1996年)、上記蛍光特性を持つAGEはほんの一部に過ぎないことが分かりだした。現在、ヒト血漿中のAGEを励起波長390nm、蛍光波長450nmで単純に測定することは、信頼性のある測定法ではないと認識されている。以来、蛍光特性による評価も測定手順に分子篩や化学処理を施したり、蛍光がどのAGE構造の蛍光を反映するかを考慮して評価するようになった。また、特異的な免疫学的測定方法で測定を試みる動きもある。これまで同定されたAG

E構造はCML(カルボキシメチルリジン)、CEL(カルボキシエチルリジン)、ペントシジン、ピラリン、クロスリン、フルオロリンク、イミダゾロン、X1、アルグピリミジンなど10種類程度あるが、これら全てのAGE構造がカルボニルストレス産物として病因性を持っているわけではないとも言われている(Kidney International、51巻、1170頁、1997年)。このためAGEに始まるカルボニルストレス原因説がより一層複雑になっている問題があり、糖尿病性合併症に代表される各種血管病変を引き起こすカルボニルストレス産物を選択的、且つ、有効的に吸着できる材料は存在しなかった。

従って、現在このような糖尿病性合併症をはじめとする動脈硬化などの各種血管病変についての治療は有効なものが乏しい。さらに腎症を併発すれば進行程度を弱める治療はあっても、有効な根治的治療手段は皆無に等しく、患者の予後の悪化は加速するために多くの問題を抱えている。現在でも、AGE形成などのカルボニルストレス産物が原因と思われる動脈硬化などの血管病変を罹患した患者の有効な治療手段は希求されている。

本発明は、特定の受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を含むペプチド、或いは、カルボニルストレス産物をエпитープとする抗体を水不溶性担体に固定した体外循環用材料の提供と、糖尿病や人工透析など排泄・代謝機能が低下した結果などでカルボニルストレスが病的に亢進した状態で、動脈硬化などの各種血管病変の原因となるカルボニルストレス産物などの糖尿病合併症因子を吸着除去しうる供給可能な吸着体及び方法を提供することを目的とするものである。

発明の開示

本発明は、上記目的を達成するために以下の構成を有する。

「(1)配列番号1で表される受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を有するペプチドを水不溶性担体に固定した体外循環用材料。

「(2)カルボニルストレス産物をエпитープとする抗体を固定した水不溶性担体であることを特徴とする体外循環用材料」

「(3)上記(1)項に記載のペプチド若しくは(2)項に記載の抗体のうちで、少なくとも何れかと結合できる糖尿病合併症因子を特異的に除去できる物質を水不溶性

担体に固定してなる糖尿病合併症因子吸着体」。

「(4) 上記(1)～(3)項に記載の糖尿病合併症因子吸着体或いは充填される容器、及び、その吸着体或いは容器内に被処理液を接触させることを特徴とする糖尿病合併症因子除去方法。」

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明で言う糖尿病合併症因子吸着体は、水不溶性担体に糖尿病合併症因子と特異的に結合できる物質を固定したものならなんでも良く、特に限定されるものではない。

ここで言う糖尿病合併症因子の病因性とは、糖尿病合併症因子と細胞が接触することで、各種サイトカインの誘導、細胞遊走化促進、DNA合成の亢進、接着分子発現亢進、NF- κ Bの活性化による酸化ストレスの誘導などの何れかもしくは複数の現象を引き起こし、結果として、動脈硬化、腎症、網膜症、神経症などの血管病変を引き起こすことを言う。また、糖尿病合併症因子は糖尿病に限定されて見られる増悪因子ではなく、人工透析など排泄・代謝機能の低下の場合にも見られることがある。特に糖尿病患者に多く見られる、血管病変に関わる合併症因子の総称である。

糖尿病合併症因子に代表されるカルボニルストレス産物とは、カルボニルストレスを受ける側が必ずしもタンパク質だけではなく、リポタンパク質に代表される脂質関連タンパク質や脂質そのものに由来していても良く、また、タンパク質のような大分子量のものだけではなく、分子量1万以下のペプチド成分やホルモン、核酸などの多糖体由来成分やビタミンなど各種低分子の代謝産物由来であっても良く、場合によっては、アミノ酸そのものや、アミノ酸関連物質、糖関連物質、脂質関連物質等の代謝産物由来であってもよく、糖尿病合併症因子としてカルボニルストレス反応を受けるのであれば、由来はこれらに限定されるものではない。

糖尿病合併症因子のうちで、カルボニルストレスなどの非酵素的変性反応を生み出す反応性物質は、生体中で起こり得るものなら特に限定を受けない。詳しく

は、マロンジアルデヒドやグリオキサル、メチルグリオキサル、3-デオキシグルコゾン等の反応性の高い化合物だけではなく、グルコース、フルクトース、リボースなどの還元糖由来であっても良い。またこれら還元糖が、リン酸エステル化した代謝産物であっても良く、一般的にこれら非酵素的な変性誘導をカルボニルストレスと言うこともある。

カルボニルストレスなどの生体中の変性反応を引き起こすものは上記の反応性のあるカルボニル化合物だけではなく、活性酸素、ヒドロキシラジカル、一酸化窒素及びそれら代謝産物などの酸化性能を有するラジカルなどの化合物であっても良く、化合物種はこれ以外であっても良い。特に酸化反応は脂質関連の変性には注目されたが、最近では、糖尿病性合併症で原因といわれる前進性糖化反応にも酸化反応が深く関わっていることが分かってきた。つまり、カルボニルストレス産物に代表される非酵素的変性物質の生成は非常に複雑な反応形態を有している。

先にも述べたように、糖尿病合併症因子としてのカルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質の検出方法については、生体内で生成する非酵素的変性物質がすべて病因性を示すわけではないので、糖尿病合併症の原因となる糖尿病合併症因子の直接的な評価は困難とされてきた。そのため、糖尿病合併症因子として生理活性を持つ非酵素的変性物質を選択的に除去できることが好ましい。

最近、糖尿病合併症因子のうちで非酵素的変性物質の病因性は、主に細胞上のある特殊な受容体と結合することで引き起こされることが分かってきた。その多くは一般的にスカベンジャー受容体と呼ばれるものだが、本来別の機能を有する受容体にカルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質が相互作用することで病因性を引き起こす場合も報告されている。ガレクチン-3、RAGE (Receptor for AGE) などである。特にRAGEは糖尿病の3大合併症である腎症、網膜症、神経症の発症を引き起こすだけではなく、動脈硬化も助長することがわかってきた。最近になり、動物レベルでRAGEと糖尿病状態で亢進するある特定の物質との相互作用で糖尿病性合併症などの血管障害が引き起こされることが証明されつつある(第42回日本糖尿病学会)。現在、糖尿病合併症因子の病因性を引き出す経路はRAGEが最も重要であると考えられているが、本発明の受容体は特にこれらに限定

されるものではない。

ごく最近になって、RAGEと相互作用しうる糖尿病合併症因子は、カルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質だけではないことが指摘されるようになった。つまり、糖尿病などカルボニルストレスが病的に亢進する状態でも、RAGEと相互作用しうる糖尿病合併症因子は非酵素的変性物質だけではなく、ある種の炎症マーカーの一群であるHMG-1、血清アミロイドA、S100/カルグラニュリンスーパーファミリーと呼ばれる物質も関わっていることがわかってきた。これらを総称して、EN-RAGE(extracellular newly identified RAGE-binding protein)とも定義される(Cell、97巻、889頁、1999年)。S100/カルグラニュリンスーパーファミリーと呼ばれる物質は血管内皮細胞、単球由来マクロファージやリンパ球などから産生されることが知られている。糖尿病などカルボニルストレスが病的に亢進する状態でも免疫系が亢進していることは指摘されており、その一端に非酵素的変性物質が関与していることが考えられる。

また近年になって、糖尿病などの動脈硬化の患者の血液中にはAGEの一群でもあるCMLなどのカルボニルストレス産物に対する抗体価が上昇しているという報告や、透析患者では過酸化脂質などの変性脂質に対する抗体価も亢進していることが知られており、カルボニルストレス産物などの非酵素的変性物質が抗原提示性を有して、慢性的な炎症を引き起こし、血管障害を助長している可能性も出てきた。その可能性ある経路の一つに、抗原性を有する非酵素的変性物質が血管内皮細胞、単球由来マクロファージやリンパ球などを直接若しくは間接的に刺激して産生されるS100/カルグラニュリンスーパーファミリーと呼ばれる物質が関与していることが挙げられる。また、抗原性を持つAGEは上記以外にも多く報告されており、特に限定を受けない。

つまり、糖尿病合併症因子は、RAGEなどの病因性を引き起こす受容体に直接相互作用できるものか、抗原性を有するなどして免疫系を刺激し、その結果、EN-RAGEと定義される一群の物質の産生を亢進するなどして間接的にRAGEなどの病因性を引き起こす受容体と相互作用するものである。これら糖尿病合併症因子を特異的に除去するには、病因性を引き起こす受容体の糖尿病合併症因子結合活性部分を少なくとも有するものか、抗原性を示すカルボニルストレス産物などの非酵

素的変性物質のエピトープ部分を認識する抗体を結合リガンドとして利用すればよい。

ところで最近になって、RAGEは糖尿病合併症の発症ばかりでなく、血清アミロイドA、アミリン、 β アミロイドなどと相互作用することで、アミロイド形成を促すことも知られるようになった(Nature Medicine、6巻、643頁、2000年)。また一方で、RAGE結合性物質であるHMG-1は神経細胞の突起伸張促進作用ばかりでなく、敗血症の致死効果の強いレイトメディエーターや癌細胞の転移や増殖を促す物質としても再評価されており、RAGEは様々な病態に関与していることが示唆されている。つまり、RAGE固定化材料を提供することは、これまで医薬では治療が困難であった糖尿病合併症の治療だけではなく、透析合併症やアルツハイマーなどのアミロイド関連病の治療や敗血症、ガン治療の可能性も提供することになり、極めて意義深いことがわかってきた。

ところで、RAGE或いは抗体固定化体外循環材料を提供しようとした場合は、水不溶性担体に固定するリガンドはタンパク質由来であるために、安価に提供できなければ供給は困難である。現在は、目的とするタンパク質由来のリガンドを遺伝子組み換え或いは細胞工学的な手法を用いて得られることが可能となった。以前は、哺乳動物由来のタンパク質も大腸菌などの細菌を宿主として発現を試みていたが、成功率は必ずしも高くない。特に膜タンパク質や抗体などの大分子量のタンパク質は細菌での産生が特に困難である。特に、膜タンパク質など不溶化等が原因で、一般的に安定大量発現が困難とされるものの場合は、必ずしも膜タンパク質の全配列を発現しなくても必要な活性が得られる手段をとる場合がある。つまり、究極的には糖尿病合併症因子との結合活性を有するドメインだけを選択的に発現すれば良く、場合にもよるが一般論として、このような活性ドメインを構成する最小アミノ酸数は30(ヒトRAGE全配列の7%に相当)から50アミノ酸(ヒトRAGE全配列の12%に相当)とされている。また、糖尿病合併症因子の吸着リガンドとして選んだRAGEについては、ヒト、ウシ、ラット、マウスなどからのクローニングが報告されているが、動物間変異が多少見られる。もともとRAGEはマルチリガンド受容体として同定されており、動物間変異を考慮した受容体アミノ酸配列でも、糖尿病合併症因子との結合活性が維持されるのであれば、吸着リ

グランドに使用しても良い。この場合の動物間変異は、RAGEと糖尿病合併症因子との結合は細胞外ドメインで行われていることを考慮し、また、リグランドは生体適合性を考慮して、抗原性が極力低いものと考えてヒト由来ものを選んだので、ヒトを基準にして74%以上のアミノ酸配列があっても利用できる。また、発現宿主が大腸菌などの細菌類にするのであれば、発現安定性を考慮して分子量2万程度まで落とす必要も要求される場合があり、この場合は糖尿病合併症因子との結合に必要なドメインをもう少し絞り込むことが好ましい。従って、好ましくは、ヒトを基準に40%以上のアミノ酸配列を有していれば、細菌を宿主にして比較的安定発現が行える糖尿病合併症因子結合活性リグランドが得られる。吸着リグランドを全血処理など抗原提示性を持つと問題がある用途に用いるのであれば、やはりヒト由来のリグランドが無難であるが、RAGEにはこれまで細胞外ドメインのアミノ酸変異にして4箇所の報告がある遺伝子多型を持つ受容体であることを考慮しなければならない。この場合、結合活性に必要な細胞外ドメインの全配列を用いたとしてヒトを基準に受容体全配列の84%(ヒトRAGEの細胞外ドメイン全配列と遺伝子多型の4アミノ酸残基を考慮した場合)から85%(ヒトRAGEの細胞外ドメイン全配列を用いた場合)以上が維持されていればより好適である。この場合は、発現リグランドの分子量が2万を大きく越えてくるのでリグランド発現が困難になってくることがあるが、昆虫細胞を使った遺伝子組み替えで発現が可能となった。

RAGEの全配列かその一部配列が、組み換え体として簡単に単離、精製するために人工配列を遺伝子上に挿入することができる。精製法には他に、RAGEに対する抗体カラムで精製する方法がある。天然アミノ酸で構成される人工配列を挿入すれば精製は簡便である。天然アミノ酸で構成される人工配列にはHis-TagやGSTやFc、プロテインA、プロテインGなどが多く用いられる。また特異なケースでは、あるアミノ酸配列の抗体を利用できる場合には、抗原提示性を有したアミノ酸配列を人工配列として用いる場合もできる。組み換え体に新規の抗原提示性を持たせる場合には、最低1アミノ酸を変換すれば良い。この利点としては、天然アミノ酸で構成される人工配列挿入時に注意すべきホスト側組み換え体のfoldingの影響を最小限に抑えることができ、同時に、溶解度などの組み換え体の物理化学

的特性の変化も最小限にできる。天然アミノ酸で構成される人工配列の挿入箇所は、膜タンパク質の場合は一般的にC末側が良いとされるが、効率的発現や非 *in situ* 下での正常な *folding* のためや目的・用途に応じて、N末側やドメイン内へ天然アミノ酸で構成される人工配列を挿入することもある。上記以外にも効率の良い天然アミノ酸で構成される人工配列は存在し、目的に応じて有用と思われる天然アミノ酸で構成される人工配列を挿入すれば良く、記載された方法に限定されるものではない。また、挿入されるアミノ酸は各種天然アミノ酸誘導体のような非天然アミノ酸でも問題はなく使用できる。

抗体については、ミエローマを使った細胞融合でモノクローナル抗体が得られるようになった。抗血清やポリクローナル抗体をリガンドに用いる場合はロット間差があるので、できればモノクローナル抗体を用いる方がよい。ただし、糖尿病合併症因子のなかでも非酵素的変性物質はRAGE結合関与や抗原提示に様々な未知な構造も含まれることが予想されるので、検出・評価には抗血清やポリクローナル抗体を用いると精度は落ちるが比較的可能でなく検出することが可能となり好ましいと言える。現在、CMLやピラリン、ペントシジン、アルグピリミジンに対するモノクローナル抗体が購入可能であり、リガンドに利用可能であるが、この他の非酵素的変性物質に対する抗体はあるので上述した抗体以外でもリガンドに利用できる。また、タンパク質やペプチドなど生体物質で構成されたりリガンド以外にも、化学合成された糖尿病合併症因子吸着リガンドを利用しても良く、特に限定を受けるものではない。

今回用いたリガンドは、抗体についてはポリクローナル抗体と細胞融合技術を使ったモノクローナル抗体であり、膜タンパク質由来成分は昆虫細胞を使った遺伝子組み換え技術を利用して得られたものである。膜タンパク質や発現困難なタンパク質についてもタンパク質の発現方法には現在多くの経済的に有望な方法があるので、特にこれらに限定されなくても良い。

上記の概念は、カルボニルストレス産物などの生体由来物質と結合可能な受容体そのもの若しくはその一部や抗体をリガンドに用いる場合であるが、生産コストや安定供給を考慮すると、一般的に化学合成のリガンドを用いた場合が有利な場合が多い。しかし、請求項1や5に記載の受容体や抗体と結合可能な生体由来

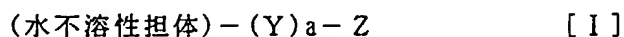
物質と親和性を有する化学合成のリガンドを見いだすには、多くの試行錯誤が必要である。

そこで鋭意検討の結果、請求項 1 や 5 に記載の受容体や抗体と結合可能な生体由来物質と親和性を有する化学合成のリガンドに必要な性質には、少なくとも次の何れかを満足すればよいことがわかった。また、2 つ以上の性質を満足しても良い。

「性質 (1) カチオン化した原子を含むこと」

「性質 (2) 反応性アミンを含むこと」

「性質 (3) 次式 [I] で表されること。



Y : アミド、または、ケトンのうちで何れかの官能基

Z : $-(\text{環式化合物 } 1)_l-(\text{鎖状化合物})_m-(\text{環式化合物 } 2)_n-NH_2$ であり、
且つ、炭素原子を 1 つ以上持つ官能基

a、l、m、n : 0、または、1 以上の整数。

性質 (1) において、カチオン化原子は 4 級アミンであると、カルボニルストレス産物と最も親和性が高くなるが、生理的 pH 付近において、必ずしもカチオン性構造でなくても良いことも見いだした。生理的 pH 付近においてカチオン性構造を形成する場合には、少なくとも一つ以上の N 原子が必要であり、構造上 N 原子が正電荷を有している場合について見いだしたが、正電荷性原子は必ずしも N 原子だけとは限らず、正電荷を有する可能性として C 原子、Si 原子、P 原子でも良いし、無機化合物を含む有機金属であっても良く、正電荷性であるのならば特に限定を受けない。そして、生理的 pH 付近において非カチオン性構造を形成する場合には、性質 (2) に示されるように、微少正電荷性官能基の近傍即ち α 位若しくは β 位に水酸基やアミノ基のような電子吸引性官能基が存在すると、例え

ば反応性アミンのように、より好ましい親和性を有することが多い。非イオン性の正電荷性官能基の中には、近傍に電子吸引性官能基が存在することでイオン性構造になる場合もあるが、特に問題を有しない。具体的な正電荷性官能基の一般例としては、2、3級アミン即ちイミン、4級アミン即ちアンモニウム塩といった脂肪族性のN含有官能基があり、また、ピロリジン、ピラロリジン、ピペリジン、ピペラジン等のN含有環化脂肪族性官能基であっても良く、さらに、環化構造中に2重結合を有するピロール、ピロリン、ピラゾール、イミダゾール、トリアゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、トリアジン、インドール、ベンジイミダゾール、プリン、キノリン、カルバゾール、アクリジン、フェナントロリン等の芳香族系複素環化合物や、また、オキサゾール、チアゾール、モルフォリン、フェノチアジン等の環化脂肪族系若しくは芳香族性官能基中にO、S等の電気陰性度の高い原子を含有するトルイジン環のような構造であっても良く、特にこれに限定されるわけではない。また、正電荷性官能基の近傍に存在する電子吸引性官能基の例としては、水酸基、カルボキシル基、カルボニル基、アセチル基、ニトロ基、エステル基、ハロゲン基、スルホン酸基、リン酸基、フェニル基に代表される芳香族官能基等があるがこれだけとは限らず、特に限定を受けるわけではない。

特に好ましくは、全血接触に対して生体適合性がよいとされる非イオン性の正電荷性構造が良いが、処理対象が全血ではない場合や前処理に血漿分離等を行えば問題は解決されるので、イオン性の有無については特に実施上の制約を受けない。

より良い血液適合性を求めるならば、一般的に性質(3)に記載したリガンドがよい。このリガンドで最も好適な構造は、化学式〔I〕中のZ基の中に4-アミノジフェニルメタン基のような芳香族アミンが含まれることであるが、ここで用いられる芳香族は必ずしも6員環である必要はなく、環構造の大きさは5員環以上10員環以下であれば特に問題はないが特に限定を受けるものではない。また、Z基中の環式化合物1及び2と鎖状化合物については、特に限定を受けることはなく、また、炭化水素系化合物に限定される必要もない。

より詳しくは、Z基中の環式化合物1及び2は、シクロヘキサン、シクロペン

タンの様な脂環式化合物や、さらにメチル基、エチル基、イソブチル基などが結合した脂環式化合物誘導体でもよい。好ましくは、フェニル基、ジフェニルメチル基、ナフチル基等の芳香族化合物が挙げられるが、さらにハロゲン基、アルキル基、水酸基、ニトロ基、スルホン酸基、カルボキシル基の芳香族誘導体でも用いることが出来る。より好ましくは、芳香族アミン誘導体が用いられるが、特に限定を受けない。また、炭化水素系化合物に限定する必要はなく、ピロリジン、ピラロリジン、ピペリジン、ピペラジン等のN含有環化脂肪族性官能基であっても良く、さらに、環化構造中に2重結合を有するピロール、ピロリン、ピラゾール、イミダゾール、トリアゾール、ピリジン、ピリダジン、ピリミジン、ピラジン、トリアジン、インドール、ベンジイミダゾール、プリン、キノリン、カルバゾール、アクリジン、フェナントロリン等の芳香族系複素環化合物や、また、オキサゾール、チアゾール、モルフォリン、フェノチアジン等の環化脂肪族系若しくは芳香族性官能基中にO、S等の電気陰性度の高い原子を含有するトルイジン環のような構造であっても良く、特にこれに記載された構造に限定されるわけではない。同様にZ基中の鎖状化合物も限定を受けるものではなく、エチル基、ヘキシル基、オクチル基、ドデシル基の直鎖状の構造やイソプロピル基、ジエチルメチレン基のような分岐状の構造でもよく、また、直鎖或いは分岐ポリエチレンイミンのような含窒素鎖状構造でもよく、特に限定を受けない。好ましくはメチレン基が挙げられるが、特にこれに記載の構造に限定されることはない。

また、糖尿病合併症因子除去を目的とした吸着体設計を行う際に、より好ましい性能がある。カルボニルストレス産物以外のRAGE結合物質との親和性が高い場合、糖尿病合併症治療効果の向上だけではなく、アルツハイマーや透析アミロイドや若年性Ⅱ型糖尿病などに代表されるアミロイド関連病治療、免疫疾患治療、敗血症、ガン治療などRAGEが関与する疾病への適応が期待でき、より好適である。カルボニルストレス産物以外のRAGE結合性物質として挙げられるのは、例えば、HMG-1、S100スーパーファミリー、血清アミロイドA、 β アミロイド、アミリンなどが挙げられるが、RAGE結合物質は今後も新たに発見されることが予想されるため、特にこれらに限定されるものではなく、RAGE結合性物質であれば除去対象となる。除去率の目安としては、実施例に記載された吸着実験方法で3

0%以上あれば良い。

さらに、RAGE結合物質以外でも非処理液からRAGE結合物質と同時に除去された方が好適な物質がある。例えば、糖尿病性合併症が悪化した場合には、腎不全を経由して人工透析の施行を余儀なくされる。長期の人工透析患者は、透析アミロイドを併発して予後の悪化を引き起こす例がある。また、RAGEは体内中のアミロイド形成を助長することからも、主な透析アミロイドの構成成分である β 2ミクログロブリンを同時に除去できることが望ましい。除去率は30%以上あることが好ましい。また、肝不全になった場合には、体内の糖代謝バランスが崩れ、糖尿病症状を引き起こすことが知られている。この場合、血液中のビリルビンが上昇して神経障害を引き起こすことが知られているために、RAGE結合物質と同時にビリルビンが除去できることが望ましい。ビリルビン除去性能がある構造としては、上記の性質(1)のようなカチオン性材料を用いる場合が良い。RAGE結合物質と同時に除去した方が好ましい物質は、特にこれらに限定される物ではない。適応対象に応じて、リガンドを選択すればよい。

リガンド固定化材料は体外循環も可能でグラフト反応可能な水不溶性担体であり、より好ましくは表面積が多く取れる多孔質体形成可能な材料であり、さらにより好ましくは人工透析などのアフェレーシス時の簡便な同時使用を考えて、中空糸加工可能な素材で構成されていればよく、さらに、白血球の刺激を低く抑えられる素材であれば最適であるが、これに限定されるものではない。また、担体は有機-有機、有機-無機の複合担体でも良く、無機担体としてはガラスビーズ、シリカゲル、金属ビーズなどがあり、有機担体には架橋ポリビニルアルコール、架橋ポリアクリレート、架橋ポリアクリルアミド、架橋ポリスチレン、架橋ポリスルホン等の合成高分子や結晶性セルロース、架橋アガロース、架橋デキストランなどの多糖類からなる有機担体との組み合わせでも良い。

担体の形状は、粒状、繊維状またはそれらの高次加工品、中空糸状と任意に形状を選ぶことができ、その大きさも特に限定されない。

リガンドは担体表面上に必ずしも固定化される必要はない場合がある。つまり、体内に溶出することがあっても免疫寛容性のあるリガンドを使えば、体内の変性物質をマスキングして病因性を和らげることが可能となり、体液処理効果も上が

ることが期待される。

また、ここでいう体液由来とは、血液、血漿、血清、腹水、リンパ液、関節内液、及びこれらから得られた分画成分、並びにその他の生体由来の液性成分をいう。

リガンドを固定化する場合には、化学的な結合を用いる場合と物理的な結合を用いる場合の二つがある。化学的な結合を用いる場合には、担体表面上に水酸基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、チオール基、シラノール基、アミド基、エポキシ基、ハロゲン基、サクシニルイミド基、酸無水物基などがあげられるが、必ずしもこれらに限定されるわけではない。また、リガンドは、これら官能基修飾を受けた担体に直接結合してもよいし、何らかのスペーサー分子を介して結合することも可能である。物理的な結合を用いる場合には、リガンド側の酸もしくは塩基性側鎖と正電的結合力で結合する場合と、遷移金属などを介した配位結合を利用する場合がある。リガンドの活性が維持されるのであれば、固定化法は特に限定を受けないし、これらに限定されるものではない。

もし、滅菌時や治療などの使用時にリガンドの脱落が問題になる場合には、共有結合法により固定化することが好ましい。

本発明の吸着体を治療に用いる場合には種々の方法がある。最も簡便な方法としては患者の血液等の体液を体外に導出して血液バッグに貯め、これに本発明の吸着体を混合して変性タンパク質を除去後、フィルターを通して吸着体を除去し、体液を患者に戻す方法がある。

次の方法は吸着体をカラムに充填し、体外循環回路に組み込み、オンラインで吸着除去をするものである。処理法には全血を直接還流する方法と血液から血漿を分離してから血漿をカラムに通す方法がある。本発明の吸着体はいずれの方法にも用いることができるが、前述のごとくオンライン処理に最も適している。

ここでいう体外循環回路では本発明の吸着体を単独で用いることもできるが、他のアフエレーシス治療にも併用可能である。併用例には、人工透析回路などが挙げられ、透析療法との組み合わせに用いることもできる。

実施例 1：ヒト RAGE 細胞外ドメインのクローニング

ヒト肺 cDNA ライブラリーを鋳型に P C R (polymerase chain reaction) を行い、細胞外領域上流及び下流の 2 つの断片を増幅した。P C R プライマーはヒト RAGE のデータベース配列 (Genebank accession No.M91211) を基に 4 種類設計し、各々 2 種類ずつを上流及び下流増幅プライマーとして用いた。

・上流増幅プライマー：(プライマーの RAGE 中の位置 or 塩基番号 (RAGE の開始コドン ATG の A を 1 とした))

S (1 ~ 29) 及び AS (730 ~ 749)

・下流増幅プライマー：(プライマーの RAGE 中の位置)

S (462 ~ 481) 及び AS (1007 ~ 1032)

(上流には制限酵素 EcoRI、下流には BglII の切断部位を付加した。) また、プライマーの安定性と遺伝子発現効率を上げるためにいくつかの塩基は適宜置換した。さらに、RAGE を可溶型とするため、細胞外ドメインの下流末端に終止コドン (TGA) を付加した。

2 種類の反応産物をアガロースゲル電気泳動した。さらに得られた各 P C R 増幅断片を電気泳動のゲルから回収した後、pUC18 ベクターにクローニングし、PCR 産物の塩基配列確認を行った。

実施例 2：バキュロウイルストランスファーベクターへの遺伝子挿入

バキュロウイルスベクターへのクローニングを以下のように行った。ベクターは pVL1393 (pharminogen) を用いた。まず、ベクターを制限酵素 EcoRI と BglII で切断し、アルカリフォスファターゼで脱リン酸化した後精製した。実施例 1 で得た RAGE 細胞外領域上流及び下流の 2 つの断片は以下に示す制限酵素で切断後、目的断片を精製した (目的断片の塩基数)。

・上流：EcoRI/FspI (666bp)

・下流：FspI/BglII (384bp)

精製した 2 断片を pVL1393 ベクターのポリヘドリンプロモーターの下流に挿入した。得られたクローンについて電気泳動による挿入断片のサイズ確認と塩基配列決定により、目的 DNA を持つクローンが構築できたことを確認した。

実施例 3：His-Tag 導入

実施例 2 で得られた RAGE プラスミド DNA を鋳型に P C R を行い、細胞外領域下

流末端にHis-Tagを付加した断片を増幅した。PCRプライマーは実施例1で用いた下流増幅用プライマーの終止コドンの前にHisをコードするコドン(CAT)の6回繰り返し配列を挿入したものを作製した。

・増幅プライマー:(プライマーのRAGE中の位置or塩基番号(RAGEの開始コドンATGのAを1とした))

S(462~481)及びAS(1007~1032 + (CAT)6 + (TGA)2 + BglII site)

プライマーの安定性と遺伝子発現効率を上げるためにいくつかの塩基は適宜置換した。確認の結果、ヒトRAGE細胞外ドメイン(請求項1記載の受容体アミノ酸配列のN末端側から344アミノ酸残基までの配列;但し最初のアミノ酸をGからMに変更した。)のC末端側にHis-Tagを融合した遺伝子配列を得た。

実施例4:昆虫細胞への感染とヒトRAGE細胞外ドメインの発現

バキュロウイルスを感染させる昆虫細胞はSf-9を用いた。昆虫細胞の培養、ウイルス感染、組み替えタンパク質の発現等については、次の文献を参考に操作を行った(バイオ・インダストリー: BIO INDUSTRY、40頁、10巻、1号、1993年)。

実施例5:ヒトRAGEの精製

実施例4で得られたヒトRAGE細胞外ドメインを含む培養液から目的タンパク質を精製した。精製には、HisTrap(amersham pharmacia)を用いた。一部の精製したヒトRAGE細胞外ドメインを再度HisTrapに結合させて、溶出バッファーで溶出を行わずにそのままカラムを解体してヒトRAGE結合担体として得た。ヒトRAGE結合担体の結合量は、溶出量をBCAプロテインアッセイキット(pierce)で測定した結果、約2.26mg/g-ゲルであった(吸着体1)。

実施例6:AGEの作成方法

標品の作成には、次の文献(Journal of Biological Chemistry、15巻、267(8)号、5133頁、1992年)を参考にした。抗原用にウシ由来リボヌクレアーゼA(シグマ)を使い、評価用には牛血清アルブミン(BSA)をグルコースを使って37℃、6ヶ月間反応させた。途中、pHを7以下にならないように7~7.4の範囲になるようにNaOHで滴定した。反応終了後、PBSで透析して標品を得た。

実施例 7 : A G E 抗体の作成

実施例 6 を参考に N Z W (ニュージーランド・ホワイト・ラビット) に対して免疫した。免疫手法は、細胞工学 別冊 抗ペプチド抗体実験プロトコール、48 頁を参考に行った。免疫終了後は、頸部動脈から脱血して、抗血清を得た。得られた抗血清を HiTrap ProteinG カラム (amersham pharmacia) で精製した。得られた抗体は、B S A とはほとんど反応しないが、A G E 化 B S A とは反応した。従って、この抗体は抗原性のある A G E を認識することが示された。

得られた抗血清を使って臨床検体中 (血漿) の A G E 量を測定した。測定方法は競合法を用いた。固層化抗原を実施例 6 で得られた A G E 化 B S A を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $100 \mu\text{l}$ 、2 時間インキュベートで用意した。検量線用の標品も同じく実施例 6 で得られた A G E 化 B S A を用いて、A G E 化 B S A $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の所を $1 \text{U}/\text{ml}$ とした。測定には、緩衝液 $25 \mu\text{l}$ 、測定サンプル $25 \mu\text{l}$ 、希釈抗体を $50 \mu\text{l}$ で反応後、固層化抗原を認識した抗体を抗ウサギ I g G ペルオキシダーゼ標識抗体 (カップル) で反応後、発色させ評価した。測定結果を以下に示す。

- ・ 健常者 (n=6): $3.92 \pm 1.27 \text{U}/\text{ml}$
- ・ 糖尿病性腎症患者 (n=10: 透析前採血): $5.72 \pm 0.82 \text{U}/\text{ml}$

上記結果は、t 検定で有意差があり、得られた抗体は患者血漿中に多く存在する A G E 抗原を認識していることが分かった。

実施例 8 : 抗体及びヒト RAGE の固定化

N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を 10 原子の長さのスペーサーを介して導入したアガロースゲル: アフィゲル 10 (Bio-Rad) 1ml に実施例 7 で得られたポリクローナル抗体 1.42mg を 0.1M HEPES-NaOH 緩衝液 (pH 7.5) 1ml に溶解した溶液を加え、 4°C で一夜ゆっくりと攪拌した。 1M エタノールアミン塩酸 (pH 8.0) 0.1ml を加えて、室温で 1.5 時間反応させ、未反応の N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を不活化した後、それぞれ 0.5M の NaCl を含む 0.1M 酢酸-NaOH (pH 4.0) 1ml 及び 0.1M 炭酸-NaOH (pH 9.0) 1ml で交互に 3 回洗浄し、最後にリン酸緩衝液にて平衡化を行った。固定化量は残存している量から逆算して、

約 1.31 mg / g-ゲルの抗体が固定化された(吸着体 2)。

また、抗体固定化法と同様の手法を使って、ヒトRAGEをアフィゲル 10 に固定化した。固定化量比は、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を 10 原子の長さのスペーサーを介して導入したアフィゲル 10 を 1 ml 当たりの量に対して、実施例 5 で得られた精製ヒトRAGEを 1.71 mg 用いた。固定化量は固定化溶液に残存している量から逆算して、約 1.42 mg / g-ゲルのヒトRAGEが固定化された(吸着体 3)。

実施例 9 : アミドメチル化繊維の生成

50 重量比の海成分 (46 重量比のポリスチレンと 4 重量比のポリプロピレンの混合物) と 50 重量比の島成分 (ポリプロピレン) とからなる米国特許 4661260 記載の海島型複合繊維 (太さ: 2.6 デニール、島の数: 16) を、50 g の N-メチロール- α -クロロアセトアミド、400 g のニトロベンゼン、400 g の 98% 硫酸、0.85 g のパラホルムアルデヒドの混合溶液と 20℃ で 1 時間反応させた。その後、繊維をニトロベンゼンで洗浄し、その後、水により反応を停止させた後、メタノールで再び洗浄することにより α -クロロアセトアミドメチル化架橋ポリスチレン繊維 (以下 AMPSt 繊維と略す。) を得た。

実施例 10 : アミドメチル化繊維への抗体及びヒトRAGEの固定化

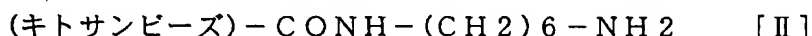
実施例 9 で得られた AMPSt 繊維をさらに水でよく洗浄し、AMPSt 繊維 (乾燥重量相当で) 0.5 g を得た。実施例 5 で得られたヒトRAGEあるいは実施例 7 で得られた抗AGE抗体を脱塩カラムで 0.1 M 重曹水溶液に置換した抗体溶液 1.28 mg / 5 ml あるいはヒトRAGE溶液 1.08 mg / 8 ml について、各々 AMPSt 繊維 0.5 g を試験管内で 37℃ で 2 時間ゆっくり振とうしながら反応させた。反応前後の固定化量は吸光度で測定して、抗体固定化繊維では 0.82 mg / g-繊維の抗体が固定化できた(吸着体 4)。ヒトRAGE固定化繊維では 1.18 mg / g-繊維のヒトRAGEが固定化できた(吸着体 5)。各々の固定化繊維を 0.1 M エタノールアミン-塩酸 (pH 8.0) 5 ml に交換して、室温で 1.5 時間反応させ、未反応の α -クロロアセトアミドメチル基を不活化した後、それぞれ 0.5 M の NaCl を含む 0.1 M 酢酸-NaOH (pH 4.0) 1 ml 及び 0.1 M 炭酸-NaOH (pH 9.0) 1 ml で交互に 3 回洗浄し、最後にリ

ン酸緩衝液にて平衡化を行い、吸着実験に使用した。

実施例 11：非生体分子固定化ビーズの作製

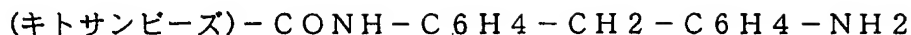
粒径 0.1 mm のキトサンビーズ (富士紡㈱製、"キトパール" AL-01) 12 ml (沈降時体積、乾燥時重量は 1.0 g) をジメチルホルムアミド中で攪拌する。この操作を 1 回 20 分間、4 回繰り返し、含水水分をジメチルホルムアミドと完全に置換させた。

このビーズを 10 g のヘキサメチレンジイソシアネートを溶解させた 1 リットルのジメチルホルムアミドに徐々に添加し、攪拌しながら室温で 1 時間反応させた後、これらを取り出し、別々に準備しておいた 1 リットルのジメチルホルムアミド中に入れて 20 分間洗浄操作を行い、この洗浄操作を 3 回繰り返し未反応ヘキサメチレンジイソシアネートを完全に除去した。ついで、水洗を 4 回行い、ジメチルホルムアミドを水と置換し、さらに 0.1 M の水酸化ナトリウム溶液と攪拌しながら室温で 20 分間反応させイソシアネート基を 1 級アミノ基に加水分解し、さらに水洗を 4 回行い、最後に 80℃ の水中で 20 分間浸せきし、次の構造式を有するキトサンビーズを得た (吸着体 6)。



また、実施例 11 記載の AL-01 (乾燥重量 1.0 g) に対して、同じく、ジメチルホルムアミド中での攪拌操作を 1 回 20 分間、4 回繰り返し、含水水分をジメチルホルムアミドと完全に置換させたビーズを 15 g の 4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネートを溶解させた 1 リットルのジメチルホルムアミドに徐々に添加し、攪拌しながら室温で 1 時間反応させた後、これらを取り出し、別々に準備しておいた 1 リットルのジメチルホルムアミド中に入れて 20 分間洗浄操作を行い、この洗浄を 3 回繰り返し未反応 4, 4'-ジフェニルメタンジイソシアネートを完全に除去した。ついで、水洗を 4 回行い、ジメチルホルムアミドを水と置換し、さらに 0.1 M の水酸化ナトリウム溶液と攪拌しながら室温で 20 分間反応させイソシアネート基を 1 級アミノ基に加水分解し、さらに水洗を 4 回行い、最後に 80℃ の水中で 20 分間浸せきし、次の構造式を有するキトサンビ

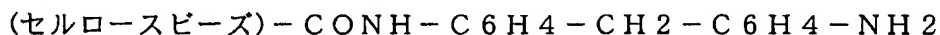
ーズを得た(吸着体7)。



[Ⅲ]

さらに、セルロースビーズ(セルロファインGCL-200cc;乾燥重量1.0g)に対して、同じく、ジメチルホルムアミド中での攪拌操作を1回20分間、4回繰り返し、含水水分をジメチルホルムアミドと完全に置換させた。

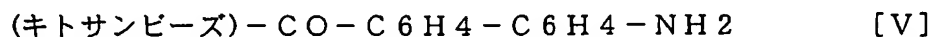
このビーズを15gの4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネートを溶解させた1リットルのジメチルホルムアミドに徐々に添加し、攪拌しながら室温で1時間反応させた後、これらを取り出し、別々に準備しておいた1リットルのジメチルホルムアミド中に入れて20分間洗浄操作を行い、この洗浄を3回繰り返し未反応4,4'-ジフェニルメタンジイソシアネートを完全に除去した。ついで、水洗を4回行い、ジメチルホルムアミドを水と置換し、さらに0.1Mの水酸化ナトリウム溶液と攪拌しながら室温で20分間反応させイソシアネート基を1級アミノ基に加水分解し、さらに水洗を4回行い、最後に80℃の水中で20分間浸せきし、次の構造式を有するセルロースビーズを得た(吸着体8)。



[Ⅳ]

他にも、実施例11記載のAL-01(乾燥重量1.0g)に対して、同じく、ジメチルホルムアミド中での攪拌操作を1回20分間、4回繰り返し、含水水分をジメチルホルムアミドと完全に置換させたビーズを15gの4,4'-ビフェニルジカルボニルクロライドを溶解させた1リットルのジメチルホルムアミドに徐々に添加し、攪拌しながら室温で1時間反応させた後、これらを取り出し、別々に準備しておいた1リットルのジメチルホルムアミド中に入れて20分間洗浄操作を行い、この洗浄を3回繰り返し未反応4,4'-ビフェニルジカルボニル

クロライドを完全に除去した。ついで、水洗を4回行い、ジメチルホルムアミドを水と置換し、さらに0.1Mの水酸化ナトリウム溶液と攪拌しながら室温で20分間反応させイソシアネート基を1級アミノ基に加水分解し、さらに水洗を4回行い、最後に80℃の水中で20分間浸せきし、次の構造式を有するキトサンビーズを得た(吸着体9)。



実施例12：吸着体のAGE吸着試験

実施例5、8、10、11で得られた吸着体、及び、市販の吸着体を使って、AGE吸着実験を行った。形状がゲルの場合は沈降体積で吸着体100 μ lあたり、サンプル(実施例6で得られたAGE化BSA量を10 μ g/ml含む0.5%BSA-リン酸緩衝液)を900 μ l加えた。形状が繊維の場合は、AMPSt繊維の乾燥重量で50 μ gあたり、サンプルを1ml加えた。37℃の孵卵器中で2時間ゆっくり振とうした。この反応液を3000rpmで5分間遠心分離して吸着体を沈降させ、上清中のAGE量を実施例7に記載した免疫学的測定法で測定した。

その他、市販の吸着体として、カチオン性担体には、TSK-gel QAE-TOYOPEARL 650M(東ソー製：吸着体10)を使用し、また、反応性アミン固定化担体には、アミノセルロファイン(チッソ製：吸着体11)を用いた。AGEに親和性を持つカチオン性担体は、記載したものに限定されることはなく、生理的pH条件でカチオン性を示すものならば特に限定を受けない。反応性アミン固定化担体についても、生理的条件で同様の反応性を示すのであれば、同じく特に限定を受けない。

AGE吸着体	AGE吸着率(%)
・ RAGE固定化ビーズ(吸着体1)：	54.2
・ 抗体固定化ビーズ(吸着体2)：	68.3
・ RAGE固定化ビーズ(吸着体3)：	52.1

・抗体固定化繊維(吸着体4) :	65.3
・RAGE固定化繊維(吸着体5) :	51.8
・改質キトサンビーズ(吸着体6) :	45.5
・改質キトサンビーズ(吸着体7) :	65.7
・改質セルロースビーズ(吸着体8) :	51.7
・改質キトサンビーズ(吸着体9) :	50.9
・カチオン性ビーズ(吸着体10) :	90.6
・反応性アミン固定化ビーズ(吸着体11) :	70.5

AGEに対して良好な選択性を見せた。RAGE若しくは抗体を固定化した担体ではAGEと良好な親和性を有していたと言える。また、各種改質ビーズについても良好な親和性を示した。特に、AGEに対する親和性については、カチオン性ビーズと反応性アミン固定化ビーズについて、良好であった。

比較例1：吸着体のAGE結合試験2

実施例8で使用したアフィゲル10を1Mエタノールアミン-塩酸(pH8.0)0.1mlを加えて、室温で1.5時間反応させ、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル基を不活化した担体(吸着体12)と実施例9で作成したAMPSt繊維(吸着体13)を用いて実施例11と同様の操作でAGEに対する吸着実験を行った。また、実施例12に記載される吸着実験が、AGEのキャリアーであるBSAに対する親和性で吸着率が左右されないことを確認するために、TSK-gel AF-Blue TOYOPEARL 650M(東ソー：吸着体14)を用いた場合のAGE吸着性能も調べた。

吸着体	AGE吸着率(%)
・不活化処理ビーズ(吸着体12) :	3.2
・AMPSt繊維(実施例13) :	5.3
・BSA親和性担体(実施例14) :	20.5

結果は、AGEに対する顕著な親和性を示さなかった。糖尿病合併症因子に対して特異的な親和性を持つリガンドを固定化することにより、AGEに対して特

異的な親和性が生じることが示された。

比較例 2 : 吸着体の AGE 吸着試験 3

実施例 5、8、10、11 で得られた吸着体、及び、市販の吸着体を使って、AGE 吸着実験を行った。ここでは、実施例 6 で得られた AGE 化 BSA に対して、更に RAGE 結合アフィニティーカラムを使って RAGE 結合性 AGE のみに精製したものを使用した。RAGE 結合アフィニティーゲルは、実施例 8 で得られた吸着体 3 を使用した。オープンカラムに RAGE 結合ゲルを 3 ml 充填し、10 ml の PBS で洗浄した。次に実施例 6 で得られた AGE 化 BSA を 30 mg / 1 ml 添加し、50 ml の PBS で RAGE 非結合性 AGE 化 BSA を除去した。次に、0.1 M グリシン塩酸緩衝液 (pH 2.0) を加えて結合した AGE 化 BSA を回収した。回収した AGE 化 BSA を 1 M トリス塩酸緩衝液 (pH 9.0) を加えて中和後、PBS にて充分透析して目的とする RAGE 結合性 AGE を得た。BCA プロテインアッセイキット (pierce) で測定した結果、濃度は約 4.71 mg / ml であった。

吸着実験については、実施例 12 と同様に、形状がゲルの場合は沈降体積で吸着体 100 μ l あたり、サンプル (RAGE 結合性 AGE 量を 10 μ g / ml 含む 0.5 % BSA - リン酸緩衝液) を 900 μ l 加えた。形状が繊維の場合は、AMP St 繊維の乾燥重量で 50 μ g あたり、サンプルを 1 ml 加えた。37℃ の孵卵器中で 2 時間ゆっくり振とうした。この反応液を 3000 rpm で 5 分間遠心分離して吸着体を沈降させ、上清中の AGE 量を実施例 7 に記載した免疫学的測定法で測定した。

市販の吸着体としては、カチオン性担体には、TSK-gel QAE-TOYOPEARL 650M (東ソー製：吸着体 10) を使用し、また、反応性アミン固定化担体には、アミノセルロファイン (チッソ製：吸着体 11) を用いた。AGE に親和性を持つカチオン性担体は、記載したものに限定されることはなく、生理的 pH 条件でカチオン性を示すものならば特に限定を受けない。反応性アミン固定化担体についても、生理的条件で同様の反応性を示すのであれば、同じく特に限定を受けない。

A G E 吸着体	A G E 吸着率 (%)
・ RAGE固定化ビーズ(吸着体 1) :	71.7
・ 抗体固定化ビーズ(吸着体 2) :	78.3
・ RAGE固定化ビーズ(吸着体 3) :	74.7
・ 抗体固定化繊維(吸着体 4) :	67.9
・ RAGE固定化繊維(吸着体 5) :	61.0
・ 改質キトサンビーズ(吸着体 6) :	47.4
・ 改質キトサンビーズ(吸着体 7) :	65.9
・ 改質セルロースビーズ(吸着体 8) :	53.3
・ 改質キトサンビーズ(吸着体 9) :	51.8
・ カチオン性ビーズ(吸着体 10) :	99.2
・ 反応性アミン固定化ビーズ(吸着体 11) :	71.2

RAGE結合性A G Eに対しても良好な選択性を見せた。RAGE若しくは抗体を固定化した担体でもRAGE結合性A G Eと良好な親和性を有していたと言える。また、各種改質ビーズについても良好な親和性を示した。吸着体1～11はRAGE結合性A G Eについてより良好な親和性であったと言える。

比較例3：吸着体のA G E結合試験4

比較例1で得られた吸着体12～14を用いて比較例2と同様の操作でRAGE結合性A G Eに対する吸着実験を行った。また、比較例2に記載される吸着実験が、A G EのキャリアーであるB S Aに対する親和性で吸着率が左右されないことを確認するために、TSK-gel AF-Blue TOYOPEARL 650M(東ソー：吸着体14)を用いた場合のRAGE結合性A G E吸着性能も調べた。

吸着体	A G E 吸着率 (%)
・ 不活化処理ビーズ(吸着体 12) :	3.1
・ A M P S t 繊維(実施例 13) :	4.9
・ B S A 親和性担体(実施例 14) :	18.9

結果は、比較例1同様にRAGE結合性A G Eに対する顕著な親和性を示さなかった。吸着体1～11は、糖尿病合併症因子に対して特異的な親和性を持つリガン

ドを固定化することにより、RAGE結合性AGEに対して特異的な親和性が生じることが示された。

実施例 13：吸着体のヒト血清成分吸着試験

実施例 11 記載の吸着体 7 について、ヒト血清成分吸着試験を行った。ヒト新鮮血清 10 ml について吸着体 7 を 1 g 添加し、37℃で2時間振とうした。振とう前後の上清中のヒト血液成分を測定した結果を示す。β2ミクログロブリンはELISA法で、血清アミロイドAはラテックス凝集免疫法にて測定した。

吸着対象物	吸着率 (%)
・ β2ミクログロブリン	81.3
・ 血清アミロイドA	42.3

測定の結果、吸着体 7 はAGEの他にβ2ミクログロブリン及び血清アミロイドAと親和性を有することが示された。

次に、実施例 12 記載の吸着体 10 について、同じくヒト血清成分吸着試験を行った。ヒト新鮮血清 10 ml について吸着体 10 を 1 g 添加し、37℃で2時間振とうした。振とう前後の血清中のビリルビン量について、アルカリアゾビリルビン法で測定し吸着率を算出した。

吸着対象物	吸着率 (%)
・ ビリルビン	70.2

測定の結果、吸着体 10 はAGEの他にビリルビンとも親和性を示すことが示された。

実施例 14：吸着体のHMG-1吸着試験

実施例 11 記載の吸着体 7 及び実施例 12 記載の吸着体 10 について、HMG-1吸着試験を行った。吸着体 100 μl あたり、ヒトHMG-1が100 ng/ml の濃度になるよう添加した0.5%BSA-リン酸緩衝液(pH7.2)を1 ml 加えた。37℃で2時間振とうし、反応前後の上清のHMG-1をELISA法にて測定した。

吸着体	吸着率 (%)
・ 吸着体 7	45.8
・ 吸着体 10	67.9

測定の結果、吸着体 7 及び 10 は、AGE の他に HMG-1 との親和性も持つことが示された。

実施例 15：吸着体充填容器による AGE 吸着試験

実施例 11 記載の吸着体 7 を一つの入口と一つの出口を持つ円筒状のカラムに充填した。カラム内容量は 1 ml である。吸着体の流失を防ぐ目的で、カラムの入口と出口にそれぞれフィルターを装填している。吸着体 7 を充填したカラムを使って、AGE が最終濃度で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるよう添加された 0.5% BSA-リン酸緩衝液 (pH 7.2) 10 ml 中の AGE 除去率を調べた。流速はペリスタポンプにて $0.5 \text{ ml}/\text{min}$ で実施した。各時間の AGE 濃度を ELISA 法にて測定した。

時間 (分)	吸着率 (%)
0	0
30	23.4
60	43.9
90	51.1
120	62.6

測定の結果、吸着体 7 を充填したカラムは AGE を除去する性能を有していることが示された。また、吸着処理中のカラムに充填された吸着体は、圧損による吸着体の変形もなかった。

産業上の利用可能性

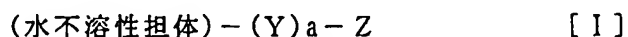
本発明の吸着体は、水不溶性担体に糖尿病合併症因子と特異的に結合できる物質を固定してなる糖尿病合併症因子吸着体であり、その糖尿病合併症因子と特異的に結合できる物質の固定方法が、共有結合或いは非共有結合を含む化学結合、または、物理結合を介して水不溶性担体に結合していることを特徴としている。使用した担体の基本構造体は、体外循環療法に使用実績があり、さらに、その糖尿病合併症因子吸着体と被処理液を接触させることを特徴とする糖尿病合併症因子除去方法に関するものであり、糖尿病合併症など非酵素的反応が原因で起こり得る血管障害の治療に極めて有用である。

請求の範囲

1. 配列番号 1 で表される受容体アミノ酸配列の全配列または部分配列を有するペプチド、を水不溶性担体に固定してなる体外循環用材料。
2. 請求項 1 に記載のペプチドの任意の場所に天然アミノ酸で構成される人工配列を 1 つ以上挿入させたことを特徴とする体外循環用材料。
3. 天然アミノ酸で構成される該人工配列の全アミノ酸数が 1 つ以上であることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の体外循環用材料。
4. 天然アミノ酸で構成される該人工配列が His-Tag であることを特徴とする請求項 1 ～ 3 のいずれかに記載の体外循環用材料。
5. カルボニルストレス産物をエпитープとする抗体を固定した水不溶性担体であることを特徴とする体外循環用材料。
6. 請求項 5 記載のエピトープがインビボとインビトロの双方で生成可能な構造であることを特徴とする体外循環用材料。
7. 請求項 5 または 6 記載のエピトープが健常者と比べて糖尿病患者の体液中で一般的に多く検出されることを特徴とする体外循環用材料。
8. 請求項 1 ～ 4 記載のペプチドの結合性物質、若しくは、請求項 5 ～ 7 記載の抗体の結合性物質との少なくとも何れかと結合ができるリガンドを水不溶性担体に固定してなる糖尿病合併症因子吸着体。
9. 請求項 8 記載の吸着体が、請求項 1 ～ 7 に記載の体外循環用材料であることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。
10. 請求項 8 記載の水不溶性担体に固定したリガンドが、非生体分子であり、且つ、カチオン化した原子を含むことを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。
11. 請求項 10 記載のカチオン化した原子が窒素原子であることを特徴とするリガンドを水不溶性担体に固定した糖尿病合併症因子吸着体。
12. 請求項 10 または 11 に記載のカチオン化した原子を含む官能基が非環化または環化脂肪族系、芳香族系、複素環化合物系の少なくとも何れかであることを特徴とするリガンドを水不溶性担体に固定した糖尿病合併症因子吸着体。

13. 請求項8記載の水不溶性担体に固定したリガンドが、非生体分子であり、且つ、反応性アミンを含むことを特徴とするリガンドを水不溶性担体に固定したことを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

14. 請求項8記載の水不溶性担体に固定したリガンドが、次式〔I〕で表されることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。



Y: アミド、または、ケトンのうちで何れかの官能基

Z: $-(\text{環式化合物}1)_l-(\text{鎖状化合物})_m-(\text{環式化合物}2)_n-NH_2$ であり、
且つ、炭素原子を1つ以上持つ官能基

a、l、m、n: 0、または、1以上の整数。

15. 化合物〔I〕に記載の官能基Yが、水不溶性担体中のアミノ基または水酸基のうちの少なくともいずれかと結合していることを特徴とする請求項14記載の糖尿病合併症因子吸着体。

16. 化合物〔I〕に記載の鎖状化合物が炭化水素化合物であることを特徴とする請求項14または15記載の糖尿病合併症因子吸着体。

17. 化合物〔I〕に記載の環式化合物2が、芳香族化合物または複素環化合物の何れかであることを特徴とする請求項14～16いずれかに記載の糖尿病合併症因子吸着体。

18. 化合物〔I〕に記載の環式化合物1が、芳香族化合物または複素環化合物の何れかであることを特徴とする請求項14～17いずれかに記載の糖尿病合併症因子吸着体。

19. 請求項1～18のいずれかに記載の水不溶性担体に固定する方法が、共有結合或いは非共有結合を含む化学結合、または、物理結合により選ばれることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

20. 請求項1～19のいずれかに記載の水不溶性担体が多糖体或いはビニル芳

香族化合物であることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

21. 請求項1～20何れかに記載の材料または吸着体で、カルボニルストレス産物の除去率が少なくとも40%以上あることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

22. 請求項21に記載の材料または吸着体で、カルボニルストレス産物以外の請求項1～4記載のペプチドの結合性物質の除去率が少なくとも30%以上あることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

23. 請求項20～21の何れかに記載の材料または吸着体で、 β 2ミクログロブリンの除去率が少なくとも30%以上あることを特徴とする糖尿病合併症因子吸着体。

24. 請求項1～23のいずれかに記載の材料または吸着体を充填したことを特徴とする糖尿病合併症因子除去容器。

25. 請求項1～24のいずれかに記載の材料または吸着体を充填した容器内に被処理液を接触させることを特徴とする糖尿病合併症因子除去方法。

26. 請求項24および25に記載の被処理液が体液由来であることを特徴とする糖尿病合併症因子除去容器及び方法。

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> 東レ株式会社 TORAY INDUSTRIES, INC.

<120> 体外循環用材料、糖尿病合併症因子吸着体、糖尿病合併症因子除去容器および糖尿病合併症因子除去方法

<130> TD-00062

<150> JP P 1 9 9 9 - 2 5 4 4 6 3

<151> 1 9 9 9 - 9 - 8

<160> 1

<210> 1

<211> 4 0 5

<212> P R T

<213> ホモサピエンス

<221> peptide

<400>

Met Ala Ala Gly Thr Ala Val Gly Ala Trp Val Leu Val Leu Ser Leu	16
Trp Gly Ala Val Val Gly Ala Gln Asn Ile Thr Ala Arg Ile Gly Glu	32
Pro Leu Val Leu Lys Cys Lys Gly Ala Pro Lys Lys Pro Pro Gln Arg	48
Leu Glu Trp Lys Leu Asn Thr Gly Arg Thr Glu Ala Trp Lys Val Leu	64
Ser Pro Gln Gly Gly Gly Pro Trp Asp Ser Val Ala Arg Val Leu Pro	80
Asn Gly Ser Leu Phe Leu Pro Ala Val Gly Ile Gln Asp Glu Gly Ile	96
Phe Arg Cys Gln Ala Met Asn Arg Asn Gly Lys Glu Thr Lys Ser Asn	112
Tyr Arg Val Arg Val Tyr Gln Ile Pro Gly Lys Pro Glu Ile Val Asp	128
Ser Ala Ser Glu Leu Thr Ala Gly Val Pro Asn Lys Val Gly Thr Cys	144

2/2

Val Ser Glu Gly Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Leu Ser Trp His Leu Asp	160
Gly Lys Pro Leu Val Pro Asn Glu Lys Gly Val Ser Val Lys Glu Gln	176
Thr Arg Arg His Pro Glu Thr Gly Leu Phe Thr Leu Gln Ser Glu Leu	192
Met Val Thr Pro Ala Arg Gly Gly Asp Pro Arg Pro Thr Phe Ser Cys	208
Ser Phe Ser Pro Gly Leu Pro Arg His Arg Ala Leu Arg Thr Ala Pro	224
Ile Gln Pro Arg Val Trp Glu Pro Val Pro Leu Glu Glu Val Gln Leu	240
Val Val Glu Pro Glu Gly Gly Ala Val Ala Pro Gly Gly Thr Val Thr	256
Leu Thr Cys Glu Val Pro Ala Gln Pro Ser Pro Gln Ile His Trp Met	272
Lys Asp Gly Val Pro Leu Pro Leu Pro Pro Ser Pro Val Leu Ile Leu	289
Pro Glu Ile Gly Pro Gln Asp Gln Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Thr	305
His Ser Ser His Gly Pro Gln Glu Ser Arg Ala Val Ser Ile Ser Ile	321
Ile Glu Pro Gly Glu Glu Gly Pro Thr Ala Gly Ser Val Gly Gly Ser	337
Gly Leu Gly Thr Leu Ala Leu Ala Leu Gly Ile Leu Gly Gly Leu Gly	353
Thr Ala Ala Leu Leu Ile Gly Val Ile Leu Trp Gln Arg Arg Gln Arg	369
Arg Gly Glu Glu Arg Lys Ala Pro Glu Asn Gln Glu Glu Glu Glu Glu	385
Arg Ala Glu Leu Asn Gln Ser Glu Glu Pro Glu Ala Gly Glu Ser Ser	401
Thr Gly Gly Pro	405

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06172

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C07K17/02, C12M1/00, A61M1/02, A61M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C07K17/02, C12M1/00, A61M1/02, A61M1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Genbank/pir/Geneseq/BIOSIS (DIALOG) /WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Neeper M, et.al., "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins.", J. Biol. Chem. (1992), Vol. 267, No. 21, p. 14998-15004	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23
Y	Makita Z, et.al., "Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo.", J. Biol. Chem. (1992), Vol. 267, No. 8, p. 5133-5138	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23
Y	Miyata T, et.al., "Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure.", Kidney Int. (1997), Vol. 51, No. 4, p. 1170-1181	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23
Y	Hofmann MA, et.al., "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides.", Cell (1999, Jun), Vol. 97, No. 7, p. 889-901	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23
Y	Briwnlee M, et.al., "Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications.",	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 December, 2000 (12.12.00)Date of mailing of the international search report
26 December, 2000 (26.12.00)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/06172

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ann Intern Med(1984), Vol.101, No.4, p.527-537 JP, 10-332693, A (Tokuyama Corp., A and T K.K.), 18 December, 1998 (18.12.98) (Family: none) Par. Nos. [0025], [0026]	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO0/06172

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K17/02, C12M1/00, A61M1/02, A61M1/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C07K17/02, C12M1/00, A61M1/02, A61M1/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

Genbank/pir/Geneseq/BIOSIS(DIALOG)/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Neeper M, et. al., "Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins.", J. Biol. Chem. (1992), Vol. 267, No. 21, p. 14998-15004	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23
Y	Makita Z, et. al., "Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo.", J. Biol. Chem. (1992), Vol. 267, No. 8, p. 5133-5138	1-9, 20, 24-26 10-19, 21-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12.12.00

国際調査報告の発送日

26.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区蔵が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

上條 登

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

4N

9839

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Miyata T, et. al., "Implication of an increased oxidative stress in the formation of advanced glycation end products in patients with end-stage renal failure." , Kidney Int. (1997), Vol. 51, No. 4, p. 1170-1181	<u>1-9, 20, 24-26</u> 10-19, 21-23
Y	Hofmann MA, et. al., "RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central cell surface receptor for S100/calgranulin polypeptides." , Cell (1999. Jun), Vol. 97, No. 7, p. 889-901	<u>1-9, 20, 24-26</u> 10-19, 21-23
Y	Briwnlee M, et. al., "Nonenzymatic glycosylation and the pathogenesis of diabetic complications." , Ann Intern Med (1984), Vol. 101, No. 4, p. 527-537	<u>1-9, 20, 24-26</u> 10-19, 21-23
Y	JP, 10-332693, A (株式会社トクヤマ、株式会社エイアンドティー) 18. 12月. 1998 (18. 12. 98) ファミリーなし 【0025】 , 【0026】 参照	<u>1-9, 20, 24-26</u> 10-19, 21-23